

# V SEMANA DO CONHECIMENTO

**CONSTRUINDO CONHECIMENTOS  
PARA A REDUÇÃO DAS DESIGUALDADES**

1 A 5 DE OUTUBRO DE 2018



**Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:**

**Resumo**

**Relato de Caso**

## **A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE COMO MÉTODO ALTERNATIVO PARA DIAGNÓSTICO DE HISTOPLASMOSE CANINA**

**AUTOR PRINCIPAL:** Fernanda Luiza Facioli.

**CO-AUTORES:** Ricardo Zanella, Adriana Costa da Motta, Carlos Bondan, Ana Paula Giolo Franz.

**ORIENTADOR:** Eraldo Lourenso Zanella.

**UNIVERSIDADE:** Universidade de Passo Fundo.

### **INTRODUÇÃO**

Na Medicina Veterinária, a análise anatomopatológica é um importante método diagnóstico na obtenção da *causa mortis* dos animais. No entanto, para a identificação de microrganismos patogênicos, ou seja, para a obtenção do agente etiológico, além do exame microbiológico e imuno-histoquímico (IHQ), a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) constitui-se de uma excelente ferramenta diagnóstica. Considerada uma revolução na área de Biologia Molecular, a PCR consiste na amplificação enzimática de um fragmento específico de DNA através da enzima DNA polimerase, junto com as quatro dNTP's (adenina, timina, citosina, guanina) e com sequências de bases nucleicas específicas (primers), reproduzindo muitas vezes uma região de interesse do genoma extraído de um ser vivo (HAAS, 2016). O objetivo deste trabalho foi identificar por meio da PCR a presença de DNA de *Histoplasma capsulatum* em diversos tecidos de um canino necropsiado, cujo diagnóstico morfológico era de histoplasmose.

### **DESENVOLVIMENTO:**

Blocos de parafina foram confeccionados a partir de amostras de fígado, linfonodos, rins e pulmões de um canino necropsiado no Laboratório de Patologia Animal da FAMV-UPF, com achados anatomopatológicos compatíveis com histoplasmose. Finas fatias de cada bloco foram cortadas com lâmina de bisturi e colocadas em eppendorfs para o processo de retirada da parafina. Primeiramente, as amostras foram submetidas a um banho de xileno por aproximadamente 50 minutos à temperatura de 60°C, seguido de um banho de álcool 99,8%, e dois banhos de álcool 70% para remoção de todo o xileno e re-hidratação do tecido parafinado. Em seguida, foi executada a extração de DNA das amostras segundo protocolo padrão do Kit PureLink (Invitrogen®). A quantidade de DNA extraído foi aferida através do espectrofotômetro Nanodrop, obtendo valores de 4,01 a 81,15 ng/mL. A qualidade das amostras apresentou-se adequada. Para a confirmação da presença ou ausência de DNA fúngico e validação da suspeita da

# V SEMANA DO CONHECIMENTO

**CONSTRUINDO CONHECIMENTOS  
PARA A REDUÇÃO DAS DESIGUALDADES**

1 A 5 DE OUTUBRO DE 2018



*causa mortis*, foi realizada uma reação de PCR que tinha por objetivo amplificar dois fragmentos específicos do genoma de *H. capsulatum*. Como descrito por Guedes *et al* (2003), foram utilizados os primers Msp1F (ACAAGAGACGACGGTAGCTTCACG) - Msp1R (GCGTTGGGGATCAAGCGATGAGCC) e Msp2F (CGGGCCGCGTTTAACAGCGCC) - Msp2R (ACCAGCGGCCATAAGGACGTC), com repetição de 35 ciclos do seguinte programa de amplificação: 95°C por 5 min, 1 min a 95°C, 1 min a 70°C, e 1 min a 72°C, seguido de 72°C por 5 min para uma única fase final de extensão. A visualização foi realizada em gel de agarose a 2% com auxílio do transiluminador. Cada fragmento do material genético amplificado deveria possuir 111pb e 279pb quando usados os primers Msp1 e Msp2, respectivamente. Para verificar a eficiência da PCR e da eletroforese em gel de agarose, foram utilizados, para cada par de primers, um controle positivo e um controle negativo, totalizando em quatro controles internos. Houve uma amplificação do controle positivo, confirmando o funcionamento da PCR, e não amplificação dos controles negativos. As amostras de todos os tecidos não amplificaram o DNA de *H. capsulatum*, sugerindo um possível diagnóstico negativo. Entretanto, podemos considerar possíveis dificuldades no processo de extração do DNA fúngico, presença de inibidores da PCR nas amostras, ou ainda a possível degradação do DNA que, conseqüentemente, poderia ter levado a um falso negativo (MERKELBACH *et al*, 1997). Assim, pretende-se continuar a investigação através da realização de imuno-histoquímica (IHQ) para concluir o diagnóstico.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS:

O presente trabalho demonstra a utilização de uma técnica alternativa de diagnóstico, ressaltando sua especificidade na identificação de microrganismos. No entanto, devido a possíveis falhas desse método para a confirmação diagnóstica, consideramos a necessidade usar outra ferramenta como a IHQ.

## REFERÊNCIAS

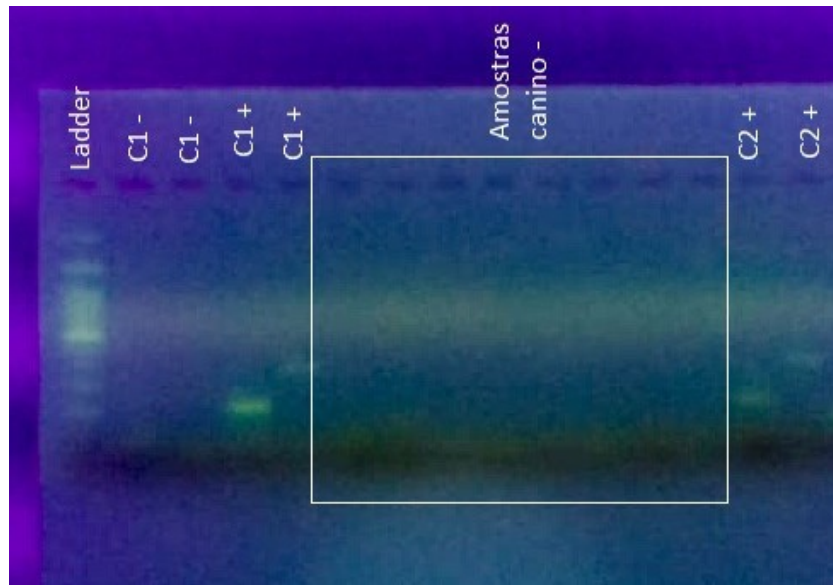
- HAAS, D.J.; TORRES, A.C.D. **Aplicações das Técnicas de PCR no Diagnóstico de Doenças Infecciosas dos Animais**. Revista Científica de Medicina Veterinária - FAEF, Jan. 2016, no. 26 p. 15.
- GUEDES, H.L.M. et al. **PCR Assay for Identification of *Histoplasma capsulatum* Based on the Nucleotide Sequence of the M Antigen**. Journal of Clinical Microbiology, Fev. 2003, vol. 41, no. 2, p. 535–539.
- MERKELBACH, S. *et al.* **Novel enzyme immunoassay and optimized DNA extraction for the detection of polymerase-chain-reaction-amplified viral DNA from paraffin-embedded tissue**. The American Journal of Pathology, v. 150, n. 5, p. 1537–1546, 1997.

## ANEXOS

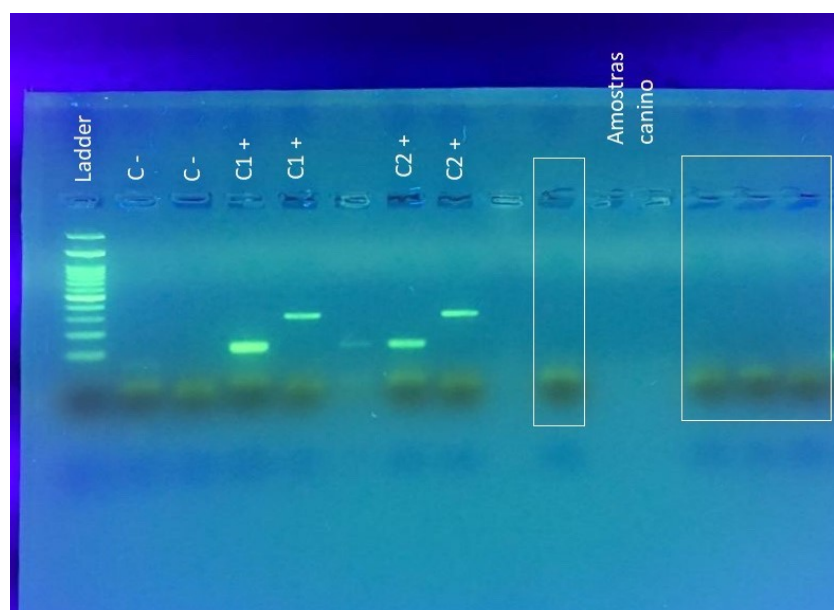
# V SEMANA DO CONHECIMENTO

CONSTRUINDO CONHECIMENTOS  
PARA A REDUÇÃO DAS DESIGUALDADES

1 A 5 DE OUTUBRO DE 2018



**Fig 1.** Gel de eletroforese. **Ladder.** Marcador de tamanho molecular. As amostras de fígado, linfonodos, rins e pulmões, assim como o controle negativo (C1 -), não apresentaram luminescência a exemplo dos controles positivos (C1 + e C2 +). A falta de luminescência indica não amplificação de DNA de *H. capsulatum*.





# V SEMANA DO CONHECIMENTO

CONSTRUINDO CONHECIMENTOS  
PARA A REDUÇÃO DAS DESIGUALDADES

1 A 5 DE OUTUBRO DE 2018



**Fig 2.** Gel de eletroforese. **Ladder.** Marcador de tamanho molecular. As amostras de fígado do canino, assim como o controle negativo (C1 -), não apresentaram luminescência a exemplo dos controles positivos (C1 + e C2 +). A falta de luminescência indica não amplificação de DNA de *H. capsulatum*.